

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 10 月 6 日 (06.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/092902 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07F 7/10 // A61K 31/519, A61P 35/00, C07B 53/00, C07D 475/04, C07M 7:00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006416

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 25 日 (25.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2004-92973 2004 年 3 月 26 日 (26.03.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 片岡 一則 (KATAOKA, Kazunori) [JP/JP]; 〒165-0031 東京都中野区上鷺宮5-17-22 Tokyo (JP). 秋山 好嗣 (AKIYAMA, Yoshitsugu) [JP/JP]; 〒114-0014 東京都北区田端1-10-21 コーポ竹201号 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小田島 平吉, 外(ODAJIMA, Heikichi et al.); 〒107-0052 東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING FOLIC ACID DERIVATIVE

(54) 発明の名称: 葉酸誘導体の製造方法

(57) Abstract: An efficient process for producing a folic acid derivative being suitable for formation of a conjugate of anticancer drug and folic acid. There is disclosed a process comprising the step of conducting a reaction between a 2-amino protected pteroylimidazole and a  $\gamma$ -lower alkyl glutamate to obtain a reaction product and the subsequent step of conducting a reaction between the reaction product and an amino compound having a reactive group capable of easily reacting with a functional group of drug.

(57) 要約: 抗癌剤と葉酸とのコンジュゲートを生成するのに適する葉酸誘導体の効率的な製造方法を提供する。2-アミノ保護プテロイルイミダゾールとグルタミン酸 $\gamma$ -低級アルキルとの反応工程、次いで生成物とドラッグの官能基と容易に反応しうる反応性基を有するアミノ化合物との反応工程を含んでなる方法が開示される。



WO 2005/092902 A1

## 明 細 書

## 葉酸誘導体の製造方法

技術分野

- 5       本発明は、葉酸誘導体、特に抗癌剤とのコンジュゲートを形成する  
のに適する葉酸誘導体の製造方法及び合成中間体に関する。

背景技術

- 近年、分子生物学の著しい進歩に伴い、種々の疾病メカニズムが分子レベルで明らかにされてきており、癌化学療法は新たな時代を迎えている。すなわち、テーラーメイド治療と言われる個々の患者に特化した治療法が求められているが、その達成には分子論的なメカニズムの解明をもとに副作用の軽減を狙ったドラッグデザインや薬物投与に関する方法論の確立が必要となる。一般に抗癌剤を用いる化学療法は放射線療法の治療が不十分な場合や白血病のように手術が適用できない場合に必要不可欠な治療法として知られている。
- 10
- 15

- しかしながら、癌化学療法ではペニシリン、ストレプトマイシンに代表される抗微生物治療の成功に比べて多くの問題点を抱えているのが現状である。その最大の理由として、抗癌剤のほとんどが人体に対して強い毒性を有するため、投与量の増大による治療効果向上の試みは副作用の併発を伴い薬物治療への限界が指摘されている。このような状況の中で、いかにして抗癌剤自身の毒性を軽減させ治療効果を上げていくかが重要なポイントになっている。最近の癌化学療法における傾向として、これら背景をもとに癌細胞を標的とする選択性の向上を狙ったドラッグターゲティングが注目されている。
- 20

葉酸は、様々な生理活性を有することが知られているビタミンB群の一種であり、細胞表面に存在する葉酸レセプターを介したエンドサイトーシスあるいはポトサイトーシスと呼ばれる機構を経て細胞内へ輸送される。したがって、ドラッグに葉酸を結合させること（葉酸-ドラッグコンジュゲートの形成）ができれば、これらメカニズムによって細胞内へのドラッグの能動的な輸送が可能となる。さらに、癌細胞においては、この葉酸を認識するレセプターが過剰に発現していることが知られており葉酸-ドラッグコンジュゲートは癌細胞へのターゲティングを行える点で期待される。例えば、ドキソルビシン（DOX、慣用名：アドリアマイシン）あるいはアンチセンスオリゴデオキシヌクレオタイド（ODN）と葉酸を結合させた系が既に検討されておりドラッグターゲティングとしての効果が示されている（例えば、下記の非特許文献1及び2参照）。

このように、葉酸を用いた生物学的なアプローチには非常に興味深い点が多く、その葉酸誘導体の重要性は広く認識されている。しかし、非特許文献1及び2に記載のコンジュゲートとは異なり、これまでの葉酸-ドラッグを直接共有結合して得られるコンジュゲートは合成面において多くの問題点が指摘されている。すなわち、葉酸とドラッグを共有結合させる場合、DCCなどの縮合剤を用いて結合させる場合がほとんどであるが、このときの生成物は $\alpha$ 体と $\gamma$ 体の両方の混合物として得られてしまうことがよくある。しかし、これら混合物から目的化合物のみを精製することは非常に困難である。また、 $\alpha$ 体の葉酸誘導体はレセプターの認識能がないため生化学領域でのアプリケーションにとって全く意味をもたないと考えられる。さらに、 $\gamma$ 体

のみを得る葉酸誘導体の合成方法もいくつか報告されてはいるが総じて反応工程が長く汎用性に欠けている。

これらの中で、ある程度有望な製造方法も提案されている。例えば、葉酸の構造の一部であるプテロイル部に対応するプテロイン酸からプテロイルアジドを形成し、次いでグルタミン酸  $\gamma$ -メチルを反応させ、キー中間体としての葉酸  $\gamma$ -メチルエステルを提供し、こうして得られた中間体をエチレンジアミンと反応させた後、エチレンジアミンに由来する遊離のアミノ基を介して腫瘍特異性金属バインディングリガンド (DTPA) を結合させる方法及びこの方法により得られる化合物が提供されている (例えば、下記の非特許文献 3 参照)。

しかし、これらの製造方法は上記のキー中間体に至るまでに多くの反応段階を経る必要があり、また、キー中間体それ自体は有機合成反応に常用される有機溶媒に殆ど不溶性である。他方、Nomura M. et al., は上記のキー中間体は有機溶媒に対する溶解性が低いことのみならず、 $\gamma$ -メチルエステル部の求核剤との反応性が相対的に低いことを指摘した上で、まず、プテロイン酸におけるプテリジン環の 2 位のアミノ基を親油基で保護し、次いで、カルボキシル基をイミダゾリドへ転化した後、該イミダゾリドをグルタミン酸の  $\gamma$ -カルボキシル基を遊離のまま保持し、 $\alpha$ -カルボキシル基を親油性基で保護したグルタミン酸誘導体と反応させて、上記キー中間体に対応する中間体を得る方法を提案している (例えば、下記の非特許文献 4 参照)。

Nomura et al., は縮合剤を用い、このような中間体の遊離の  $\gamma$ -カルボキシル基とドラッグのアミノ基との間で共有結合を形成したコンジュゲートを得ている。しかし、 $\gamma$ -カルボキシル基を遊離のまま

保持し、 $\alpha$ -カルボキシル基を親油性基で保護したグルタミン酸誘導体を取得するためには多段階の工程を必要とする。

#### 引用文献の一覧

- 5 非特許文献 1 : Lee, R. J. et al., J. Biol. Chem. 1994, 269, 3198-3204
- 非特許文献 2 : Wang, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995, 92, 3318-3322
- 非特許文献 3 : Luo, J. et al., J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 10004-10013
- 10 非特許文献 4 : Nomura M. et. al., J. Org. Chem. 2000, 65, 5016-5021

#### 発明の開示

15 以上に述べた従来法に比べ、より短い反応工程で葉酸の  $\gamma$ -位カルボキシル基部のみに選択的に目的とする反応性基を導入できる方法を入手することが望まれる。本発明は、上記のような従来法が有していた問題を解決しようとするものであり、より短い反応工程にて達成できる新規な  $\gamma$ -位選択的な葉酸誘導体の製造方法を提供することを目的とする。

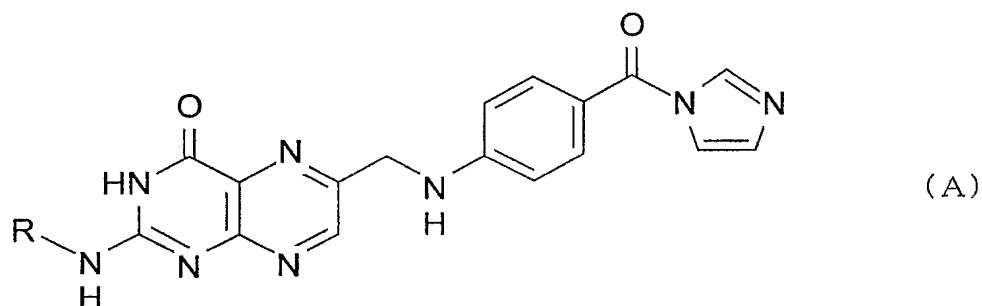
20 上述したとおり、非特許文献 3 に記載されたキー中間体である葉酸  $\gamma$ -メチルエステルは有機溶媒に対する溶解性が低く、また、求核剤との反応性も低いことが非特許文献 4 (特に、5016 頁右欄下から 2 行～5017 頁左欄本文 4 行参照) において指摘されている。しかし、非特許文献 4 に記載された該キー中間体に対応する化合物の前駆体である 2-アミノ保護プテロイン酸のイミダゾリドから得られる 2

ーアミノ保護葉酸の  $\gamma$ -低級アルキルエステルは、Nomura M. et. al., が示唆するのとは異なり、 $\alpha$ -カルボキシル基が遊離であっても、有機合成反応に常用される有機溶媒に溶解し、しかも該エステル基とアミノ化合物との反応により容易にアミノ化合物残基を葉酸に共有結合できることを本発明者らは見出した。

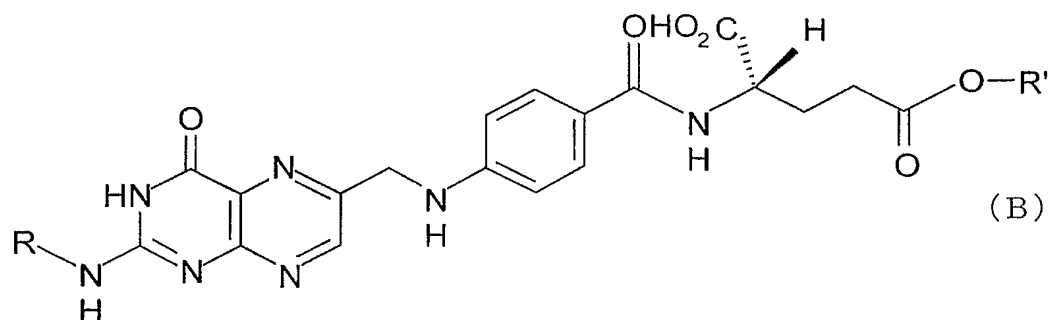
5

したがって、上記課題を解決すべき手段として、

a) 式 (A) :

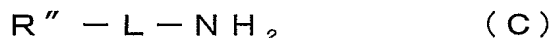


10 (式中、Rはアミノ基の保護基を表す) で表されるイミダゾリドを有機溶媒中、塩基の存在下でL-グルタミン酸  $\gamma$ -低級アルキルと反応させ、式 (B) :



(式中、Rは式(A)について定義したのと同義であり、そしてR'は低級アルキル基を表す)で表される2-アミノ保護葉酸 $\gamma$ -低級アルキルを生成する工程、

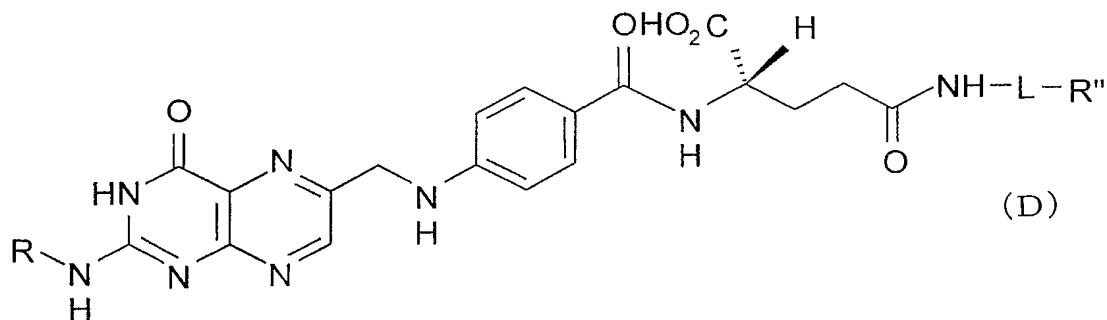
- b) 式(B)で表される2-アミノ保護葉酸 $\gamma$ -低級アルキルを  
5 有機溶媒の存在下または不存在下で、式(C) :



[式中、R''は有機化合物の官能基と容易に反応することができる反応性基を表し、Lは結合、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルキレンまたは式



- 10 (ここで、R<sup>o</sup>は水素原子またはメチル基を表し、nは1~10, 000の整数である)のオリゴもしくはポリ(オキシアルキレン)を表す。]のアミン化合物と反応させて、式(D) :



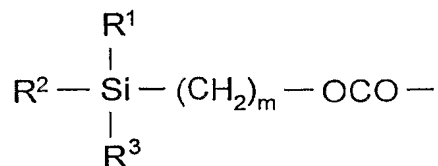
- 15 (式中、Rは式(A)について定義したのと同義であり、LおよびR''は式(C)について定義したのと同義である)の葉酸誘導体を生成する工程、  
を含んでなる葉酸誘導体の製造方法を提供する。

また、本発明者らが知る限り、上記の式（B）で表される、プテリジン環の2位アミノ基が保護されており、そして  $\gamma$  位カルボキシル基が低級アルキルエステル基の化合物は従来技術文献未載の化合物である。したがって、このような化合物も本発明の一態様として提供される。

以下、本発明の具体的な態様について説明する。

本発明に関して使用する「低級アルキル」基の語は、炭素原子数1～6の分岐もしくは直鎖のアルキル基（ $C_1 - C_6$ アルキルと表示する）を意味し、具体的な基としては、メチル、エチル、*n*-プロピル、*i*s*o*-プロピル、*n*-ブチル、*t*er*t*-ブチル、*n*-ヘキシル、等が挙げられる。

式（A）におけるアミノ基の保護基（R）は、目的に応じて容易に脱離できる基であって、例えば、ペプチド合成に際してアミノ酸のアミノ基の保護に用いられる保護基（例えば、ベンジルオキシカルボニル基、*t*-ブトキシカルボニル基、アセチル基、等）またはトリフルオロトリフルオロメタンスルホニル基、*p*-トルエンスルホニル基、有機シリル残基、等を包含する多種多様な基であることができるが、好ましくは、式



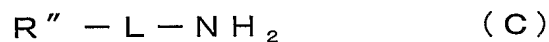
（式中、 $R^1$ 、 $R^2$ および $R^3$ は、相互に独立して低級アルキル基を表し、 $m$ は1～4の整数を表す）で表される基である。



これらの基としては、トリメチルシリルメトキシカルボニル、2-  
トリメチルシリルエトキシカルボニル、3-トリメチルシリルプロポ  
キシカルボニル、2-エチルジメチルシリルエトキシカルボニル、2-  
tert-ブチルジメチルシリルエトキシカルボニル、トリエチル  
5 シリルメトキシカルボニル、2-トリエチルシリルエトキシカルボニ  
ル、等を挙ることができる。

このようなアミノ基の保護基（特に、トリメチルシリルエトキシカ  
ルボニル基）を有する式（A）で表される化合物は、非特許文献4に  
記載されているように、プロテイン酸をN, N'-カルボニルジイミ  
10 ダゾール（CDI）および2-（トリメチルシリル）エタノールと反  
応させることにより、またはこれらに類似する方法により得ることが  
できる。本発明に従う工程a）は、式（A）の化合物を有機溶媒、好  
ましくは極性非プロトン性溶媒、例えば、ジメチルスルホキシド（D  
MSO）、N, N'-ジメチルホルムアミド（DMF）、N-メチル  
15 ピロリドン、等に溶解させ、塩基、好ましくは、有機強塩基、例えば、  
N-メチル-1, 5, 9-トリアザビシクロ[4. 4. 0]デセン（M  
TBD）、1, 8-ジアザビシクロ[5. 4. 0]ウンデセ-7-エン  
（DBU）、等の存在下でグルタミン酸の $\gamma$ -低級アルキルエステ  
ルと反応させることによって実施する。反応温度、反応時間は、使用  
20 する塩基等によって最適条件が変動するが、グルタミン酸のラセミ化  
が起こらない温度を選ぶことを優先させる。通常、室温で約20時間  
前後反応させるのがよい。こうして、式（B）の化合物が高収率で得  
られる。

工程 b) は、ドラッグ、特に抗癌剤（必要により機能化された）と共有結合を形成しうる反応性基を導入する段階である。この工程は、式 (B) の化合物を有機溶媒（好ましくは、上記の工程 a) で使用する溶媒）の存在下または溶媒の不存在下（特に、式 (B) の化合物と  
5 反応させる下記のアミノ化合物が室温で液体である場合）で、式 (C)



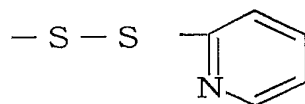
で表されるアミノ化合物と反応させて、 $\gamma$ -低級アルキルエステルのアルコキシ基が式 (C) の化合物に由来する  $R'' - L - NH -$  基  
10 で置換された上記の式 (D) で表される化合物を提供する。

式 (C) の  $R''$  についていう、有機化合物、特に、抗癌剤の官能基（本来の抗癌剤の構造中に、必要により、本発明の目的に沿うようにまたは本発明の反応に供することができるように導入された官能基を包含する）と容易に反応することができる反応性基とは、葉酸が、例  
15 えば癌細胞において発現されている葉酸を認識するレセプターに結合する能力に悪影響を及ぼすことなく有機化合物の官能基と反応して共有結合を形成しうる基を意味する。このような反応性基としては、

(i) アミノ基 ( $-NH_2$ )、

(ii) 置換ジスルフィド基、例えば、

20



(iii) アセチレン基：



および (i v) アジド基 ( $-N_3$ )

を挙げることができる。これらの反応性基は、式 (C) の化合物のアミノ基に直接結合しているか、または連結基 (L) :  $C_1 - C_5$  アル

5 キレン、例えば、メチレン、ジ-、トリ-、テトラ-もしくはペンタ (メチレン)、あるいは式



(式中、 $R^0$  は水素原子またはメチル基を表し、 $n$  は 1 ~ 10,000 の整数である。) で表されるオリゴ-もしくはポリ (オキシアルキ  
10 レン) 鎖、

を介して該アミノ基に結合している。

このような反応性基を有する式 (D) の化合物は、それ自体公知の温和な反応条件により、該反応性基と反応しうるドラッグ、特に、抗癌剤の官能基と反応して共有結合を形成し、葉酸-ドラッグコンジュ  
15 ゲートを提供できる。

限定されるものでないが、上記 (i) ~ (i v) の反応性基は、それぞれ、以下の官能基と反応して共有結合を形成することができる。

(i) アミノ基の場合には、例えば、ドキソルビシンの 13 位炭素カルボニル基とシッフ塩基を介して容易に葉酸とドラッグを結合させる  
20 ることができる。注目すべきは、ヒドラジド基を用いて形成されたシッフ塩基がエンドソーム内の酸性条件下でその結合を再び切断することである (例えば、Angew. Chem. Int. Ed., 42, 4640 (2003) 参照)。一般に強固な共有結合にて得られた葉酸-ドラッグコンジュゲートが細胞内に取り込まれたときの 1 つの問題点は、細胞

内エンドソームからレセプターの回収機構に伴いドラッグを再び細胞外に排出してしまうことである。このとき、細胞内エンドソーム内で葉酸とドラッグを切断させることができれば、更に薬物効果を上げることが可能となる。したがって、例えば、ヒドラジドのアミノ基とカルボニル基から形成されるシッフ塩基を介して葉酸とドキソルビシンを結合させpHに応答できるように設計すると癌細胞に過剰に発現している葉酸レセプターを介してエネルギー依存的に効率よく細胞内に葉酸とドキソルビシンのコンジュゲートが取り込まれるだけでなく、細胞内のエンドソームからリソソームに移行する過程でシッフ塩基が開裂して葉酸レセプターからドキソルビシンをリリースすることができる。こうして、レセプターが細胞表面へ回収される際にドキソルビシンが細胞外へ排出されることなく効率的な細胞内薬物リリースの達成が期待される。また、適する場合にはドラッグを予めスクシンイミジル化等により機能化した活性エステルとしておき、アミド結合を形成することもできる。

(i i) 置換ジスルフィド基の場合には、必要があれば、ドラッグの一部へ既知の方法でチオール基を導入しておき、該チオール基と置換ジスルフィド基の開裂を伴うジスルフィド結合を形成することができる。

20 (i i i) アセチレン基の場合には、必要があればドラッグの一部へ既知の方法でアジド基を導入しておき、アセチレン基とアジド基との間での、所謂、ヒュースゲンの1,3-双極環化付加反応

(Huisegen 1,3-dipolar cycloadditions) によるトリアゾール環の形成を介して葉酸-ドラッグコンジュゲートを形成することが

できる（該双極環化付加反応については、例えば、Angew. Chem. , 2002, 114, p. 2708-2711 参照）。

- （i v） アジド基の場合には、必要があればドラッグの一部へ既知の方法でアセチレン基を導入しておき、上記（i i i）と同様に葉酸
- 5   ードラッグコンジュゲートを形成することができる。

こうして、本発明によれば、ドラッグと葉酸とのコンジュゲートを形成するのに適する葉酸誘導体の製造方法が提供できる。また、上記の工程 a）及び工程 b）における生成物は、必要により、それ自体既知のクロマトグラフィー、溶媒抽出、再結晶、等により単離できる。

- 10   以下、具体例を挙げて本発明を説明するが、本発明をこれらに限定することを意図するものでない。

#### 製造例 1（参考例）

1- [2-N- [2-（トリメチルシリル）エトキシカルボニル] プテロイル] イミダゾールの合成

- 15   プテロイン酸 3.0 g とトリエチルアミン（TEA） 5.35 mL を混ぜたところへ DMSO 50 mL に溶解させた CDI 6.24 g を加え、室温で 3.5 時間反応させた。そして、2-（トリメチルシリル）エタノール（9.63 mL）を加え、更に室温中で 5 時間反応させた。目的化合物は、水（10 mL）-酢酸（0.32 mL）とジ
- 20   エチルエーテル（6.4 mL）に反応溶液を滴下してしばらくの間、強く攪拌した後、吸引ろ過を行い固体として回収した。次いで、カラム精製（シリカゲルカラム；溶離液クロロホルム中 10%メタノール）を行い、最後に、減圧乾燥にて 2.67 g（収率 54.8%）の目的化合物を回収した。

## 製造例 2 (実施例)

2-N-[2-(トリメチルシリル)エトキシカルボニル]葉酸  $\gamma$ -  
メチルエステルの合成

DMSO 10 mL に 1-[2-N-[2-(トリメチルシリル)  
5 エトキシカルボニル]プテロイル]イミダゾール 1.0 g (1.97  
mmol) と MTBD 0.7 mL (4.88 mmol) を溶解させた  
ものをグルタミン酸  $\gamma$ -メチルエステル 0.477 g (2.96 mmol)  
へ滴下して室温中で 21 時間反応させた。精製処理では、酢酸  
水 (1 M, 30 mL) - メタノール (15 mL) と  $\text{CHCl}_3$  (30  
10 mL) に反応溶液を滴下し有機層を酢酸 (1 M) メタノール (1 : 1,  
20 mL) と水 - メタノール (2 : 1, 30 mL, 2 回) で洗浄し、  
次いで、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で脱水し、ろ過後、溶媒をエバポレーションに  
より溜去した。最後に  $\text{CHCl}_3$  ジエチルエーテル洗浄にて 1.05  
g (収率 88.5%) の目的化合物を回収した。この化合物は  $^1\text{H}$  N  
15 MR の測定から目的化合物であると同定された (イミダゾール基に由  
来するピークの 1 つ (7.1 ppm) が完全に消失し、新たに、グル  
タミン酸のメチルエステル基に由来するピーク (3.6 ppm) が観  
察された。 ) 。

## 製造例 3 (実施例)

20 葉酸  $\gamma$ -ヒドラジド` の合成

無水ヒドラジン 10 mL 中に 2-N-[2-(トリメチルシリル)  
エトキシカルボニル]葉酸  $\gamma$ -メチルエステル 0.21 g を溶解させ  
て 50°C、3 時間反応させた。反応終了後、溶液を減圧下で除去し p  
H 1.0 塩酸水溶液 10 mL に再溶解させて室温にて 1 時間攪拌した。

次にNaOH水溶液で中和後に凍結乾燥し、純水に再溶解させて遠心操作を2回行うことによって脱塩した。最後に、凍結乾燥にて黄色い粉体として目的化合物を回収した。

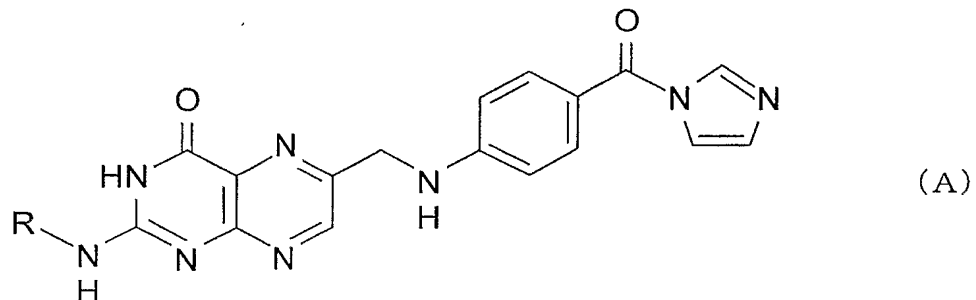
#### 産業上の利用可能性

- 5 上述したように本発明の方法は、ドラッグ、特に抗癌剤と葉酸ードラッグコンジュゲートを提供するための葉酸誘導体を提供でき、医薬製造業で利用できる。

## 請 求 の 範 囲

1. 下記の工程を含んでなる葉酸誘導体の製造方法：

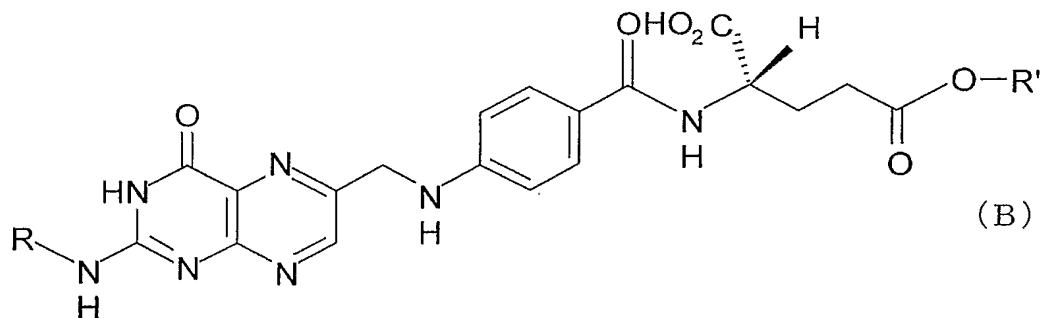
a) 式 (A)：



5

(式中、Rはアミノ基の保護基を表す)

で表されるイミダゾリドを有機溶媒中塩基の存在下でL-グルタミン酸γ-低級アルキルと反応させ、式 (B)：



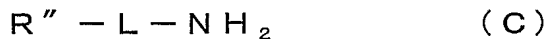
10

(式中、Rは式 (A) について定義したのと同義であり、そしてR'は低級アルキル基を表す)

で表される2-アミノ保護葉酸γ-低級アルキルを生成する工程、



b) 式 (B) で表される 2-アミノ保護葉酸  $\gamma$ -低級アルキルを有機溶媒の存在下または不存在下で、式 (C) :



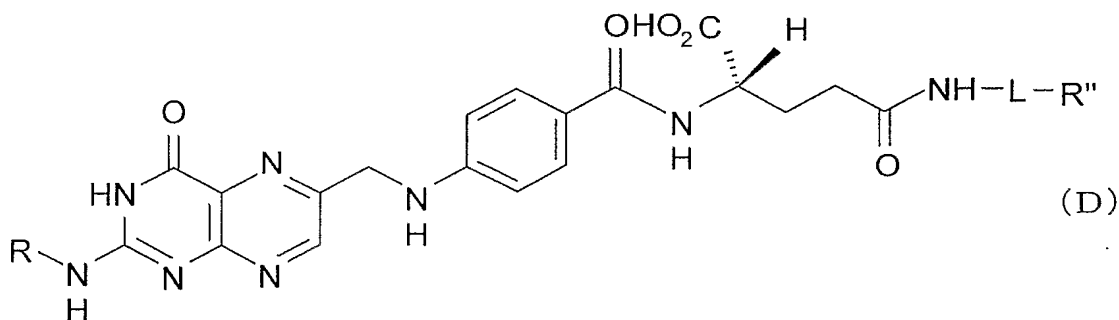
{式中、 $R''$  は有機化合物の官能基と容易に反応することができる反

5 応性基を表し、 $L$  は結合、 $C_1 - C_5$  アルキレンまたは式



(ここで、 $R^\circ$  は水素原子またはメチル基を表し、 $n$  は 1 ~ 10, 000 の整数である) のオリゴもしくはポリ (オキシアルキレン) を表す}

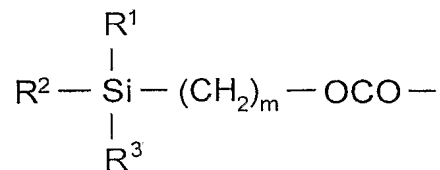
10 のアミン化合物と反応させて、式 (D) :



(式中、 $R$  は式 (A) について定義したのと同義であり、 $L$  および  $R''$  は式 (C) について定義したのと同義である)

15 の葉酸誘導体を生成する工程。

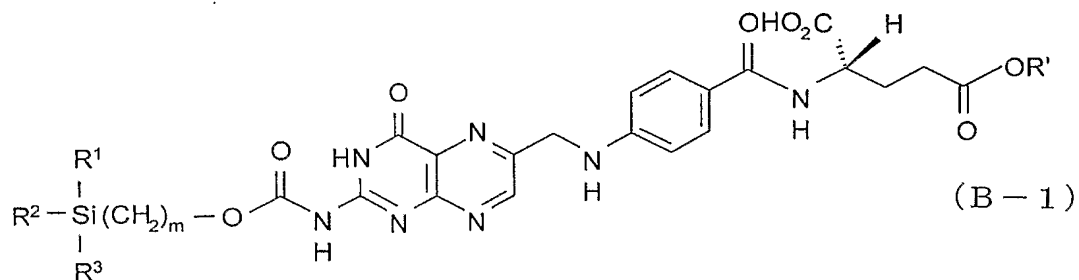
2. 式 (A) 中の  $R$  が式



(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ は相互に独立して低級アルキル基を表し、 $m$ は1～4の整数を表す)

で表される基であることを特徴とする請求項1記載の方法。

5 3. 式(B-1) :



(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ は相互に独立して低級アルキル基を表し、 $m$ は1～4の整数を表し、そして $\text{R}'$ は低級アルキル基を表す)

10 で表される2-アミノ保護葉酸  $\gamma$ -低級アルキル。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006416

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C07F7/10//A61K31/519, A61P35/00, C07B53/00, C07D475/04, C07M7:00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C07F7/10//A61K31/519, A61P35/00, C07B53/00, C07D475/04, C07M7:00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Makoto NOMURA et al., Development of an Efficient Intermediate, $\alpha$ -[2-(Trimethylsilyl)]-2-N-[2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl] folic Acid, for the Synthesis of Folate( $\gamma$ )-Conjugates, and Its Application to the Synthesis of Folate-Nucleoside Conjugates, J.Org.chem., No.65, pages 5016 to 5021, 2000	1-3
A	WO 02/085908 A1 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION), 31 October, 2002 (31.10.02), & EP 1389209 A1 & US 2004/242582 A1	1-3



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 April, 2005 (21.04.05)

Date of mailing of the international search report

17 May, 2005 (17.05.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl.<sup>7</sup> C07F7/10 // A61K31/519, A61P35/00, C07B53/00, C07D475/04, C07M7:00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl.<sup>7</sup> C07F7/10 // A61K31/519, A61P35/00, C07B53/00, C07D475/04, C07M7:00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 5 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Makoto NOMURA, et al., Development of an Efficient Intermediate, $\alpha$ -[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]-2-N-[2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl]folic Acid, for the Synthesis of Folate ( $\gamma$ )-Conjugates, and Its Application to the Synthesis of Folate-Nucleoside Conjugates, J. Org. Chem., No. 65, P. 5016-5021, 2000	1 - 3
A	WO 02/085908 A1 (PURDUE RESEATCH FOUNDATION) 2002.10.31 & EP 1389209 A1 & US 2004/242582 A1	1 - 3

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 1 . 0 4 . 2 0 0 5

国際調査報告の発送日

17. 5. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

関 美 祝

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 3

4 H

9 0 4 5